Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Zur Chemie der Zellhaut der Cyanophyceen

Von

Gustav Klein

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der k. k. Universität in Wien
Nr. 75 der zweiten Folge.

(Mit 1 Tafel)

(Vorgelegt in der Sitzung am 14. Oktober 1915)

Die chemische Beschaffenheit der Zellhaut bei den Algen, zumal den Cyanophyceen, ist zum großen Teil noch unbekannt. Es existieren verhältnismäßig wenige Angaben und diese widersprechen einander, was wohl mit der Kleinheit der Objekte und der dadurch bedingten Schwierigkeit der chemischen Untersuchung in Zusammenhang stehen dürfte.

Auf Grund der ziemlich großen Widerstandsfähigkeit der Membranen und Scheiden der Cyanophyceen glaubten Gommont, Macchiati und Borzi annehmen zu dürfen, daß die Substanz der Scheiden und Membranen der Cuticularsubstanz höherer Pflanzen ähnlich oder gleich sei. Dagegen konnte später eindeutig gezeigt werden, daß dies nicht der Fall ist. Die Frage nach der chemischen Beschaffenheit der Cyanophyceenmembran streifte dann v. Wisselingh in seiner Arbeit über die Zellwand der Pilze [1898] (1). Er untersuchte hierbei auch Flechten und fand, daß diejenigen Flechtengonidien, die zu den Cyanophyceen gehörten, in ihrer Membran weder Chitin, wie die Hyphen des sie umschlingenden Pilzes, noch auch Zellulose besitzen. 1901 bearbeitete R. Hegler (2) die Blaualgen monographisch und kam zu dem Resultat, daß

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Membran und Scheide neben etwas Zellulose zum größten Teil aus Chitin bestünden. Zwei Jahre später behauptete Kohl (3) ungefähr das gleiche. Dagegen konnte Wester (4) trotz eingehender Untersuchungen weder Chitin noch Zellulose finden.

Dadurch war der einzige positiv angegebene Stoff wieder zweifelhaft geworden und es galt also in erster Linie, die Frage nach dem Vorhandensein des Chitins wieder aufzunehmen. Die früher genannten Forscher benutzten zum Chitinnachweis zwei Methoden. Die zuerst verwendete war eine makrochemische und beruht darauf, das Chitin durch Behandeln mit konzentrierter HCl in salzsaures Glukosamin überzuführen, welches unschwer in Krystallform gewonnen und so auf seine chemische Beschaffenheit geprüft werden kann. Diese Methode wurde hauptsächlich von Hegler und Kohl verwendet. van Wisselingh hat, wie bekannt, für die *Fungi* eine sehr feine und sichere Methode ausgearbeitet, welche gestattet, mikrochemisch im einzelnen Faden das Chitin aufzufinden. Das Prinzip dabei ist, das Chitin durch starke Einwirkung von Lauge in das lösliche Chitosan umzuwandeln, welches auf Zusatz von verdünnter Jodlösung und Schwefelsäure eine prachtvoll rotviolette Färbung gibt. Nach diesem Verfahren hat Wester gearbeitet und überall, wo er es anwandte, sehr genaue und eindeutige Resultate erhalten. Kohl gebrauchte nur in einem einzigen Falle, nämlich bei *Tolypothrix*, die van Wisselingh'sche Reaktion, zog aber aus dem Resultat falsche Schlüsse. Hegler und Kohl stützten sich noch auf Beobachtungen im Polarisationsmikroskop, zufolge deren die Membran und Scheide vieler Cyanophyceen in größerem oder geringerem Grade doppelbrechend ist und jedenfalls nicht mit dem entsprechenden Verhalten der Cuticula übereinstimmt.

Ich arbeitete mit beiden obgenannten chemischen Methoden;[1] da ich diese nicht als allgemein bekannt annehmen kann, muß ich sie kurz skizzieren.

[1] Beide Methoden wurden zuerst an *Penicillium*- und *Mucor*-Formen, deren Hyphen ja nur aus Chitin bestehen, eingeübt.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Die Darstellung von Glukosamin setzt voraus, daß man das Chitin in möglichst reiner Form vorliegen hat. Man muß daher das Material vorerst so reinigen, daß nur die reinen Chitinmembranen übrig bleiben. Hierfür wurden verschiedene Methoden ausgearbeitet, die aber meist das Material schon angreifen. Ich hielt mich im wesentlichen an die von Scholl (5) im hiesigen Institut für *Boletus edulis* ausgearbeitete Methodik, die ja auch mit der Hegler's im großen und ganzen übereinstimmt. Man geht dabei so vor, daß man das lufttrockene, fein zerriebene Material abwechselnd mit sehr viel Wasser und zehnprozentiger Lauge kocht, so lange bis das Filtrat farblos durchs Filter läuft, was ziemlich lange dauert. Das schon ziemlich reine Material wird dann mit einer einprozentigen Kaliumpermanganatlösung versetzt und das gebildete Mangansuperoxyd mit sehr verdünnter HCl gelöst. Dann wird noch mehrmals mit Alkohol und Äther gewaschen und die fast weiße Masse getrocknet. Wird dieses reine Chitin mit konzentrierter HCl hydrolysiert, die braune Lösung filtriert und das Filtrat eingedampft oder etwas davon auf einen Objektträger gebracht, so erhält man Krystalle von salzsaurem Glukosamin, das man leicht identifizieren kann.

Verwendet wurde möglichst reine Wasserblüte oder Kulturen, die in großen Standgläsern oder Kolben aus kleinen Proben gezogen worden waren. Nun erhielt ich zwar gleich beim ersten Versuch mit *Oscillaria* die Glukosaminkrystalle, freilich im Verhältnis zur Menge der *Oscillaria* nach den Scholl'schen Bestimmungen viel zu wenig. Dann aber zeigte sich, daß das Chitin wohl nicht den Blaualgen zuzuschreiben war, sondern Verunreinigungen; bei der Wasserblüte den Krebschen (Copepoden etc.), die trotz Auslese zwischen den Rasen versteckt waren, und vielen *Fungi imperfecti*, die besonders das Standglasmaterial ganz durchsetzten, infolge ihrer Farblosigkeit aber erst durch Färben sichtbar gemacht werden konnten. Am reinsten zeigte sich *Nostoc*, da diese Form nur außen in der Gallerthülle von Pilzhyphen durchzogen war und auch tatsächlich das wenigste Glukosamin ergab. Reinkulturen konnten nicht verwendet werden, da solche Mengen, wie man sie hierzu brauchte, nicht aufgebracht werden konnten.

Jedenfalls aber bot diese Methode keine einwandfreien Ergebnisse und ich arbeitete von nun an nur mehr nach der einfacheren v. Wisselingh'schen Methode, die ja ganz eindeutige Resultate gibt.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Man geht dabei so vor, daß man eine Probe mit starker (50 bis 60%) Natronlauge in kleinen, beiderseits zugeschmolzenen Röhrchen im Ölbad erhitzt und 15 bis 20 Minuten bei dieser Temperatur beläßt. Das Material wird nach dem Abkühlen der Röhrchen diesen entnommen und erst mit Alkohol oder Glyzerin, dann mit Wasser gewaschen. Setzt man dann auf den Objektträger unter Deckglas nacheinander 1% Jodjodkali und 1% H_2SO_4 zu, so bekommt man, falls Chitin vorhanden war, jeden Faden charakteristisch gefärbt. Ich erhitzte die Röhrchen der Einfachheit halber nicht im Ölbad, sondern im Trockenschrank auf 140 bis 150° durch eine halbe Stunde, eine Zeit, die bei *Penicillium* als die günstigste erkannt worden war.

Untersucht wurden folgende Formen:[1] Von den Oscillatoriaceen *Oscillaria sancta, limosa, tenuis, Fröhlichii* und mehrere andere Arten, *Lyngbia, Schizothrix* und *Hydrocoleum*, von den Scytonemataceen *Scytonema*- und *Tolypothrix*-Arten, von den Rivulariaceen *Dichothrix* und *Rivularia*-Formen und von den Nostocaceen *Nostoc* und *Anabaena*.

Bei keiner von den vielen Proben, die ich machte, konnte ich je die Chitosanreaktion einwandfrei bekommen. Freilich störten zuerst auch hierbei oft Pilze, doch konnten, falls das Material nicht zu lange gekocht war, nach längerem Suchen immer die charakteristischen Pilzverzweigungen gefunden werden. Überdies stehen ja auch bei Pilzen die Querwände in viel weiteren Abständen als bei den Blaualgen. Vorsichtig mußte man auch bei den Formen sein, die Scheiden und Verzweigungen haben. In den Scheiden sieht man meist keine Fäden mehr; denn diese sind entweder zersetzt oder doch herausgepreßt. Diese Formen sind aber oft von Pilzhyphen direkt umstrickt, welche, wenn nicht die typischen Verzweigungen sichtbar sind, den Fäden der Blaualgen sehr ähneln, so daß man sie leicht dafür halten könnte. Von den genannten Forschern bekam nur Kohl, und zwar nur bei *Tolypothrix* eine Färbung, die er für die Chitosanreaktion hielt. Nun enthält aber *Tolypothrix*, wie ich später ausführen werde, in den Scheiden Zellulose. Es ist daher nicht zu

[1] Speziesnamen habe ich nur bei den Formen angegeben, die ich genau kannte oder als gut bestimmte Herbarexemplare bekommen konnte; bei allen anderen Formen ist nur die Gattung angegeben, da die Speziesangabe gerade bei den Blaualgen für jeden nicht sehr erfahrenen Bestimmer ohnedies fraglich ist und für meine Zwecke oft auch nicht notwendig war.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

wundern, wenn man bei Zusatz von J und H_2SO_4 in verdünnter Lösung bei der Scheide wie bei jedem Zellulosefaden eine Färbung von Rosa bis Rotviolett bekommt, was bei Kohl um so mehr der Fall war, als er statt der für die Chitosanreaktion vorgeschriebenen einprozentigen eine 16prozentige, also schon ziemlich konzentrierte H_2SO_4 verwendete. Setzt man aber konzentrierte Lösungen zu, so zeigt sich der wahre Sachverhalt, indem die Rotviolettfärbung, welche Chitosanreaktion vorgetäuscht hat, in das für Zellulose typische Tiefblau übergeht, während ja die Chitosanfärbung bei Zusatz von konzentrierteren Lösungen verschwindet und sich in ein Braungelb umwandelt.

Überhaupt machte ich die meisten Proben so, daß ich in dasselbe Röhrchen neben den Cyanophyceen noch Zellulosefäden oder *Oedogonium* und einen Pilz (*Penicillium* oder *Mucor*) gab, von deren Verhalten bei der van Wisselingh'schen Probe ich mich vorher durch einen Kontrollversuch überzeugt hatte.

Dabei erhielt ich nach Zusatz von $J + H_2SO_4$ (1 %) die Pilze herrlich rotviolett, *Oedogonium* rosa, die Cyanophyceen farblos oder wenigstens nur die Scheiden rosa gefärbt. Saugte ich konzentrierte Lösungen nach, so trat sofort Entfärbung der Pilze, Blaufärbung der Scheiden und von *Oedogonium* ein; alle anderen Formen der Blaualgen, die nicht den bescheideten Scytonemataceen und Rivulariaceen angehörten, verschwanden unter Braunfärbung.

Sehr instruktiv war auch die Färbung mit einer schwach ammoniakalischen Kongorotlösung. Gemischte Proben, wie vorher beschrieben, zeigten nach der Behandlung im Röhrchen mit dem Farbstoff folgendes Verhalten: Das Chitosan der Pilzhyphen speichert den Farbstoff intensiv mit schwer zu entfernender Farbe; die Zellulose der *Oedogonium*-Fäden färbt sich scharlachrot, läßt aber den Farbstoff wieder auswaschen, desgleichen die Scheiden; alle Blaualgen, besonders die Oscillatoriaceen, zeigen nicht eine Spur von Färbung.

Die von Viehöver (6) bei Bakterien gebrauchte Vorsicht, die Beobachtung mit 2000facher Vergrößerung, ist hier natürlich unnötig, da ja alle Formen so dick waren wie die ver-

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

wendeten Pilzhyphen, die doch immer die Färbung schon bei einer 60fachen Vergrößerung sehr gut zeigten. Charakteristisch ist auch, daß die Cyanophyceenmembranen, besonders schön zu sehen an *Oscillaria*, nach der Behandlung mit der konzentrierten Lauge nicht mehr ihre deutlichen Konturen zeigten, sondern immer mehr minder hyalin verquollen aussahen oder bei längerer Einwirkung überhaupt schon verschwunden waren, während Chitinmembranen immer scharfe Umrisse aufwiesen.

Mit einigen Worten möchte ich auf das schon erwähnte optische Verhalten, auf das sich Hegler und Kohl besonders stützten, noch einmal zurückkommen. Die beiden Forscher zeigten, daß die Zellhaut der Blaualgen in vielen Fällen doppelbrechend ist, jedoch in allen Abstufungen von starker Doppelbrechung bis zur völligen Isotropie. Aus dieser Doppelbrechung schlossen sie nun merkwürdigerweise auf Chitin, während ich Chitinfäden nie doppelbrechend fand. Es ist daher wohl nicht notwendig, hier auf diese Befunde näher einzugehen.

In diesem Zusammenhange möchte ich auch noch erwähnen, daß die von Hegler und Kohl angegebenen Löslichkeitsverhältnisse, beziehungsweise die große Resistenz nicht ganz der Wirklichkeit entsprechen, da die Hautgebilde schon sehr bald in gewöhnlicher konzentrierter H_2SO_4, in HCl und HNO_3 nach einiger Zeit gelöst werden, überdies in Eau de Javelle binnen 2 Stunden und auch in 33prozentiger Chromsäure, mit Ausnahme der Zellulosebestandteile, die ebenso wie die Chitinfäden in den beiden letzten Reagentien erst nach ungefähr einem Tage gelöst sind.

Nach all dem muß ich also sagen, daß ich entgegen den Angaben von Kohl und Hegler niemals in den Cyanophyceen Chitin gefunden habe, was mit Wester's Befunden übereinstimmt.

Nachdem diese Frage erledigt war, mußte es mich nur um so mehr interessieren, welche Stoffe die Zellhautbestandteile zusammensetzen. Da war es zuerst von Wichtigkeit, das Vorkommen und die Verbreitung der Zellulose bei den Blaualgen zu studieren, da hierüber noch nichts Sicheres bekannt war.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Ich benutzte zum Nachweis die gewöhnlichen Reagentien $J+H_2SO_4$ und Chlorzinkjod, von Farbstoffen nur Kongorot im ammoniakalischen Bade. Alle anderen Farbstoffe, die für Zellulose charakteristisch sein sollen, fand ich wenig brauchbar. Endlich wurde auch die Löslichkeit in Kupferoxydammoniak geprüft.

Dabei zeigte sich, daß bei allen Formen, die überhaupt Heterocysten haben, die Heterocystenmembran stets die Zellulosereaktion mit Chlorzinkjod sehr prompt und gut gaben, wie für viele Formen schon Kohl gefunden hatte. Besonders gut zeigte sich die Färbung nach Vorbehandlung des Materials mit verdünntem Eau de Javelle oder Chloralhydrat, da dann nur die Heterocysten schön rotviolett in dem sonst ziemlich entfärbten Präparat zu sehen waren. Dies gelang ebensowohl bei den Scytonemataceen *Scytonema* und *Tolypothrix* und den Rivulariaceen *Dichothrix, Calothrix* und *Rivularia* als auch bei den Nostocaceen *Nostoc, Cylindrospermum* und *Anabaena*; speziell bei *Nostoc*, wo man die Reaktion bisher noch nicht bekommen konnte, hoben sich in der entfärbten Gallerte an den sonst farblosen Zellfäden die leuchtend violetten Heterocysten, zu Hundert in einer Gallerte, sehr stark ab. Freilich hatte ich nur mit Chlorzinkjod Glück; mit $J+H_2SO_4$ trat wohl auch die Färbung ein, aber nur bis zur Rotviolettfärbung, die dann in ein Braun überging. Mit Kupferoxydammoniak behandelt, lösten sich die Heterocysten wohl schwer, aber doch nach genügend langer Behandlung (8 bis 14 Tagen) auf. (Die Lösung wurde wiederholt gewechselt). Viel schneller trat Lösung ein, wenn die Objekte erst längere Zeit mit kalter oder eine halbe Stunde mit kochender fünfprozentiger HCl behandelt wurden, worauf ich später noch zurückkomme.

Von dem Verhalten der Scheide war schon unter Chitin die Rede. Das dort Gesagte gilt nicht nur für *Tolypothrix*, sondern für alle Scytonemataceen und Rivulariaceen. Doch liegen hier die Verhältnisse ziemlich kompliziert. Vor allem ist zu betonen, daß die ziemlich starken, kompakten Scheiden der großen Formen immer durch einen Membranstoff braun gefärbt sind, den zuerst Nägeli (7), dann Correns (8)

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

beschrieben und *Scytonemin* nannten. Der Farbstoff gibt ähnliche Reaktionen mit $J+H_2SO_4$ und Chlorzinkjod wie Zellulose, unterscheidet sich von dieser aber dadurch, daß zum Auftreten der Reaktion nicht gerade H_2SO_4 notwendig ist, sondern eine Vorbehandlung mit einer verdünnten Säure (HCl) genügt. (Aber diese scheint doch notwendig zu sein, da mit Jod allein keine Färbung eintritt!) Die Farbe ist kein reines Blau, sondern ein Grauviolett, Violettschwarz und Rauchgrau. Mit verdünnter HCl oder H_2SO_4 färbt sich der Farbstoff grün, mit Lauge rotbraun, wird aber hierdurch verändert, indem dann keine Violettfärbung mit Jod eintritt.[1]

Will man nun die Scheiden auf Zellulose prüfen, so muß jedenfalls der Farbstoff vorher entfernt werden, was durch verschiedene Mazerationsmittel, wie Schulze's Gemisch, Chloralhydrat oder am besten mit Eau de Javelle geschehen kann. Die schon erwähnten großen Formen von *Scytonema* (*Sc. Myochrous*), *Dichothrix* (*D. gypsophila*) und *Rivularia* (*R. Sprengeliana*) mit ihren mächtigen, kompakten Scheiden zeigen nun auch nach dem Entfärben keine Zellulosereaktion. Wohl aber bekommt man die Reaktion sehr schön nach Vorbehandlung, z. B. mit Lauge, wie es bei der Chitosanprobe geschieht, sowohl mit $J+H_2SO_4$ wie auch mit Chlorzinkjod.

Dagegen zeigen die dünnen Formen mit schwächeren, röhrenförmigen Scheiden, wie *Scytonema thermale,* viele *Rivularia*-Arten und *Tolypothrix* (*T. bicolor*) auch ohne Vorbehandlung schon die typischen Zellulosereaktionen. (Viele von diesen Formen sind auch nicht oder doch schwächer braun tingiert. Doch gilt das nicht allgemein.)

Dasselbe fand ich auch bei einer scheidentragenden Oscillatoriaceengattung, nämlich *Schizothrix.* Bei *Lyngbia* und *Microcoleus* konnte ich in den Scheiden keine Zellulose finden; deren Scheiden sind auch mikroskopisch nur gallertige Gebilde.

Niemals konnte ich in den Membranen der Fadenzellen Zellulose nachweisen. Bei Zusatz der Zellulosereagentien trat immer nur Braunfärbung ein.

---

[1] Es ist mir leider nicht gelungen, den Farbstoff zu extrahieren, da er sich im Extraktionsmittel immer schon zersetzt.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Bei allen Zellulose enthaltenden Scheiden bekam ich auch mit Kongorot schöne scharlachrote Tinktion.

Doch war bei all den genannten Formen das Bild der Zellulosereaktion nicht das gleiche. Immer war die innerste Schicht, die direkt dem Zellfaden anliegt, am intensivsten gefärbt, manchmal nur sie; z. B. bei einer *Rivularia*-Art (Fig. I). Oder es zeigten sich mehrere Schichten, von denen die äußere immer nur gelb gefärbt blieb. Die Formen mit großen Scheiden zeigten schon intakt vier bis fünf Schichten, die durch die Laugenbehandlung und die Quellung mit H_2SO_4 noch deutlicher wurden und wieder verschiedene Färbung zeigten, so zwar, daß die innersten am stärksten, tief dunkelblau, die äußerste am schwächsten, lichtblau gefärbt waren.

Aus dem oben Gesagten geht hervor, daß die Scheiden nicht nur aus Zellulose bestehen können, sondern daß die Zellulose mit anderen Stoffen lose nebeneinander vorkommt oder gebunden ist, in welch letzterem Falle sie erst aus der Verbindung freigemacht werden muß. In dieser Ansicht wird man noch durch ihr Verhalten gegenüber Kupferoxydammoniak bestärkt. In keinem Falle lösten sich nämlich die Scheiden gänzlich darin, wohl aber sah man in manchen Fällen Substanz aus den Scheiden herausgelöst, diese selbst lockerer, und zwar in den Fällen, wo die Zellulose nicht gebunden war. Kochte man dagegen vorher eine Stunde mit fünfprozentiger HCl (nach dieser Behandlung sahen die Scheiden unverändert aus) und legte dann in Kupferoxydammoniak, so fand man nach 2 Tagen von den Scheiden nichts mehr. Sehr schön zeigte sich dies bei *Scytonema* und *Tolypothrix*.

Dasselbe wurde ja auch bei den Heterocysten betont, wo die Verhältnisse ähnlich liegen dürften. Um mir darüber Gewißheit zu verschaffen, versuchte ich endlich noch die Methode, die v. Wisselingh zur Reinigung von Zellulose empfahl, nämlich Erhitzen in Glyzerin im zugeschmolzenen Röhrchen im Glyzerinbad auf 300°, wobei nur Chitin und Zellulose ungelöst bleiben, während alle Hemizellulosen gelöst werden. Da Chitin ausgeschaltet war, konnte ich mit einiger Zuversicht erwarten, die Zellulose rein zu bekommen. Die Prüfung ergab, daß nur die Scheiden der Formen, bei denen

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Zellulose nachgewiesen war, sehr schön erhalten waren. Freilich waren sie gelockert, schlaff geworden, zeigten aber manchmal noch die Schichten. Daß das Übriggebliebene tatsächlich Zellulose war, zeigte die folgende Prüfung: Chlorzinkjod und besonders $J + H_2SO_4$ zeigten viel schönere, stärkere Reaktion als vor der Behandlung. Auch die gereinigten Scheiden lösten sich in Kupferoxydammoniak nur langsam, nicht nur auf dem Objektträger, sondern in Schälchen binnen einer Viertelstunde in ganz starker Lösung.

Abgesehen von diesen Scheiden wurde alles andere im Glyzerinbad gelöst, die nicht Zellulose führenden Scheiden (*Lyngbia*, *Microcoleus*), soweit ich beobachten konnte, alle Membranen, die Gallertmassen, in denen die *Nostoc*-Fäden liegen, und merkwürdigerweise alle Heterocysten, in denen doch Zellulose nachgewiesen war. Wahrscheinlich liegt hier die Zellulose nicht in kompakter Schicht, sondern vielleicht in lockerer Form vor, so daß beim Herauslösen der anderen Stoffe das lockere Zellulosegerüst zerfällt. Bei den *Nostoc*-Arten blieb also durch das Kochen von der Zellhaut nichts mehr übrig, sondern nur mehr kleine Kügelchen in großen Mengen, die sich als Reste des Zellinhalts der einzelnen Zellen entpuppten. Beigegebene *Elodea*-Blätter zeigten in all den Fällen noch gut erhaltene Zellen mit scharf konturierten Wänden. Da aber die Mittellamelle herausgelöst war, hingen die Zellen nur lose zusammen.

Betreffs der Zellulosereaktion möchte ich noch einige Erscheinungen erwähnen, die sehr oft und charakteristisch auftraten Die Scheiden quollen immer durch die Schwefelsäure- oder Chlorzinkeinwirkung sehr stark und zeigten dann merkwürdige Bildungen. Im Moment der Einwirkung sprangen in den äußersten Schichten der Scheide ringförmige Bildungen von verschiedener Gestalt ins Auge, die gegenüber der Umgebung ungleich stark tingiert waren (Fig. II). Ein besonders schöner Anblick bot sich bei den *Scytonema*-Fäden nach der Glyzerinbehandlung. Man sah die Fäden vor- und zurückschießen, sich verbreitern und dabei eine ziehharmonikaförmige Faltung mit Querlamellen zeigen, ähnlich wie sie Wiesner (9) bei Baumwollfäden angibt.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Hiermit war das Vorkommen von Zellulose in bestimmten Organen der Blaualgen, nämlich in vielen Scheiden und allen Heterocysten erwiesen, zugleich aber gezeigt, daß diese Zellulose immer mit anderen Stoffen mehr oder minder innig verbunden vorkommt und alle anderen Zellhautgebilde, besonders Membranen und Gallerthüllen, ebenfalls aus anderen Substanzen bestehen müssen. Dadurch war die weitere Arbeit vorgezeichnet.

Zufolge der gallertigen Beschaffenheit der Zellhautgebilde vieler Formen oder wenigstens der durchführbaren Verquellung derselben und auch sonst lag der Gedanke nahe, nach dem zu suchen, was man Pektinstoffe nennt. Unsere Kenntnis der Pektinstoffe und der Reaktionen auf dieselben ist freilich noch sehr mangelhaft, zumal man sich meist mit Färbungen begnügte. Als charakteristischer Farbstoff auf Pektin ist seit Mangin (10) Rutheniumrot (Rutheniumsesquichlorid) in ammoniakalischer Lösung (1 : 5000) in Verwendung. Alle anderen Farbstoffe, die ich prüfte, erwiesen sich als nicht spezifisch, da schließlich alles mehr minder damit gefärbt wurde. Bei Anwendung von Rutheniumrot zeigte sich, daß fast alle Cyanophyceen gefärbt werden, sowohl intakt als auch nach Vorbehandlung mit Eau de Javelle oder Chloralhydrat, nur in sehr verschiedenem Maße. Am besten färbten sich die stark gallertigen Bestandteile, also in erster Linie die Gallerthüllen der Nostocaceen und Chroococcaceen, wie schon Kohl gefunden hatte. Sie färbten sich so stark, daß sie schwarzpurpurn erschienen und die eigentlichen Zellfäden, welche verhältnismäßig sehr wenig gefärbt wurden, im Mikroskop kaum zu sehen waren. Bei allen Formen färbten sich auch sehr schön die äußersten, ohne Färbung nur mit Tusche wahrnehmbaren Schleimhüllen und auf diese mag in vielen Fällen ausschließlich die Färbung mit Rutheniumrot zurückzuführen sein. Sehr gut färbten auch die mehr gallertigen Scheiden der *Schizothrix*- und vieler *Rivularia*-Arten, bei letzteren vornehmlich die äußeren Partien, da ja die inneren mehr Zellulose enthalten. Die Membranen färbten schwach rosa bis rosenrot, aber auch bei derselben Form in ver-

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

schiedenen Proben verschieden stark. Die stark braun gefärbten Scheiden nahmen den Farbstoff manchmal gar nicht, manchmal, besonders nach kurzer Vorbehandlung mit Eau de Javelle, intensiv auf.

Starke Färbung fand ich an den jungen Spitzen und an Stellen, die in chemischer Umwandlung begriffen waren, sich gallertig verquollen zeigten, z. B. an manchen Stellen im Inneren der Scheide. Besonders lebhaft gefärbt zeigten sich in allen Fällen die Konkavzellen, die ja das Produkt einer chemischen Veränderung sind, welche sich in einer Verquellung aller Teile der Zelle zu erkennen gibt. Endlich war auch das Glykogen intensiv gefärbt, wenn bei der Eau de Javelle-Behandlung nicht alles entfernt worden war.

Daß alle diese Färbungen für die Diagnose der »Pektinstoffe« nicht viel besagen, geht schon daraus hervor, daß nur die native Substanz der Pektine, eine Etappe in der Reihe der Umwandlungsprodukte der sich entwickelnden Zellmembran, die Beyerinck (11) Pektose, Tschirch (12) Protopektin nennt, Rutheniumrot speichert, während die daraus entstehenden Pektine, speziell der Früchte, neben anderen Änderungen auch keine Farbstoffspeicherung mehr zeigen.

Um mich über die Menge der vorhandenen »Pektinstoffe« zu orientieren, suchte ich sie aus den Fäden herauszulösen. Das Material wurde mit zweiprozentiger HCl eine Stunde und dann einige Zeit mit zweiprozentiger NaOH oder Na_2CO_3, das schwächer wirkt, gekocht. Zum Übertragen wurde teils immer die Lösung abgegossen, teils die Fäden abzentrifugiert. Nach dem Auswaschen zeigten die Präparate, auch wenn sie lange in Rutheniumrot gelegen waren, nur mehr schwache, meist überhaupt keine Färbung mehr.

War die Reaktion zu lange ausgedehnt oder zu starke Lösung verwendet worden, so waren die Objekte sehr angegriffen oder überhaupt nicht mehr zu finden, desgleichen bei zu langer Einwirkung von alkoholischer, konzentrierter HCl. Wurde das Filtrat von der obgenannten Laugenbehandlung neutralisiert und mit Alkohol versetzt, so trat sofort eine milchige Trübung ein und nach einiger Zeit setzte sich eine feine Gallerte zu Boden. Waren die Objekte statt mit HCl

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

mit Kupferoxydammoniak vorbehandelt und dann längere Zeit in der Lauge belassen, so lösten sie sich teilweise und zerfielen direkt zu einer flockigen Gallerte, die durch Ausfällen mit Alkohol vermehrt werden konnte. Wieviel von diesen gelösten Stoffen wirklich Pektin war, entzieht sich natürlich ganz der Beurteilung.

Ich prüfte endlich noch auf jenen bisher hypothetischen Stoff, die Callose, die Mirande (13) in letzter Zeit als Hauptbestandteil der Caulerpaceenmembran fand, konnte aber keine positiven Resultate bekommen.

Seit man bei Hydrolyse von Pektinstoffen dieselben Zuckerarten, Galaktose und Arabinose gefunden hat, die man schon von der Hydrolyse der Hemizellulosen her kannte, sind die »Pektinstoffe« in ein anderes Licht gerückt, und es ist fraglich, ob die Pektinstoffe überhaupt eine besondere chemische Gruppe von Membranstoffen vorstellen oder ob man sie nicht unter den Begriff der Hemizellulosen einreihen könnte, ob sie nicht auch eine von den vielen Formen bilden, in denen die Hexosane und Pentosane untereinander und in Übergangsform miteinander verquickt in der Zellwand sich finden.

Das van Wisselingh'sche Glyzerinverfahren hatte nun gezeigt, daß eben die Hemizellulosen und pektinartigen Stoffe einen Hauptbestandteil der Zellhautgebilde der Blaualgen ausmachen und dadurch war die Frage in ein Gebiet gerückt, auf dem nur mehr makrochemisch über die Art der in Betracht kommenden Stoffe Aufschluß zu erhalten war. Diese Bestimmung der Hemizellulosen nun konnte ich leider nicht durchführen. Einmal machte das Material Schwierigkeiten, da für eine Bestimmung verhältnismäßig viel, einige Gramm Trockensubstanz, und diese vollständig frei von Verunreinigung gefordert werden mußte. Die Objekte durften auch nicht, wie das ja gewöhnlich der Fall ist, untereinander oder gar mit anderen Algengattungen vergesellschaftet sein. Dann nahm auch der Krieg die Zeit zur weiteren Arbeit auf diesem schwierigen Gebiet.

Doch hatte ich einige Vorversuche gemacht, die ein positives Resultat ergaben. Untersucht wurde *Nostoc*-Gallerte,

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

weil eben *Nostoc* leicht in größeren Mengen und relativ rein zu bekommen ist. Ich machte mehrere Pentosanbestimmungen nach der Tollens'schen Methode.[1]

Die Pentosane werden durch Kochen mit Salzsäure in Furfurol übergeführt, dieses wird abdestilliert und als Furfurolphloroglucid gefällt. In allen Fällen bekam ich einen reichlichen Niederschlag von Furfurolphloroglucid.

Schließlich möchte ich noch auf eine merkwürdige Erscheinung hinweisen, die ich erhielt, wenn ich *Nostoc* mit Eau de Javelle behandelte. Dabei schrumpfen die Plasmata und heben sich von der Wand ab. Übrig bleibt eine stark lichtbrechende Kugel, die in der Mitte der Zelle oder an der Querwand liegt, dies immer, wenn zwei Zellen im letzten Teilungsstadium waren. Bei weiterer Einwirkung, etwa nach einer Stunde, bietet sich ein sonderbares Bild. Die Gallertmassen haben sich teilweise gelöst und einzelne Zellfäden liegen frei. An diesen sind die Heterocysten ganz intakt, ebenso nach 6 Stunden. Dagegen finden wir die Fadenzellen verändert; sie hängen nicht mehr nur seitlich zusammen, sondern die Querwände sind meist bloß schattenhaft zu sehen, später überhaupt nicht mehr, dagegen zeigen sich die Längswände nicht mehr tonnenförmig voneinander abgeschnürt wie früher, sondern zwischen den einzelnen Fäden ineinander übergehend, so daß wir nicht mehr eine Reihe von selbständigen Zellen, sondern einen wellenförmigen Schlauch vor uns haben, wobei die einzelnen Wellen noch die Wölbung der einzelnen Zelle anzeigen. Diese Wellen verschwinden später auch und an der Heterocyste hängt ein schlapper Schlauch, der aber noch ebensoviele Kügelchen enthält als ursprünglich Zellen vorhanden waren. Am klarsten zeigen sich diese Verhältnisse, die erst durch Färbung sichtbar gemacht werden müssen, aus dem beiliegenden Bilde (Fig. III). Aus all dem bekommt man den Eindruck, daß diese Zellfäden doch nicht so sehr aus einzelnen Zellen bestehen, die lose aneinandergereiht sind, sondern entweder eine alle Zellen

[1] Die Methode nahm ich aus Abderhalden's »Biochemischen Arbeitsmethoden« (14).

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

zusammenhaltende äußere Schlauchschichte vorhanden ist oder die Quermembranen aus einem leichter löslichen Stoff bestehen als die Längsmembranen, die auch nach der Zellteilung in Zusammenhang bleiben.

Zusammenfassung.

1. Bei den Blaualgen konnte Chitin entgegen den Angaben von Hegler und Kohl weder mikro- noch makrochemisch nachgewiesen werden. Die van Wisselingh'sche Chitinprobe erwies sich allein als verläßlich.

2. In allen Heterocysten sowie in den Scheiden aller Scytonemataceen (*Scytonema* und *Tolypothrix*) und Rivulariaceen (*Rivularia* und *Dichothrix*), ferner der Oscillatoriacee *Schizothrix* konnte Zellulose durch die Jod-Schwefelsäure-Probe oder, wenn die Zellulose mit anderen Stoffen zusammen war, nach der van Wisselingh'schen Glyzerinbehandlung mit Jod und Schwefelsäure konstatiert werden.

3. Von den anderen Stoffen, die sich, wie das Glyzerinverfahren zeigte, reichlich in der Zellhaut finden, wurden Pektinstoffe durch Färbung und Fällung, und zwar hauptsächlich in den Gallerthüllen gefunden.

4. Makrochemisch wurden in der Nostocgallerte Pentosane durch die Furfurolphloroglucidbestimmung nachgewiesen.

5. Außerdem enthält die Arbeit Beobachtungen über histologische Eigentümlichkeiten der Blaualgenmembranen nach Behandlung mit bestimmten Reagentien.

Zum Schlusse fühle ich mit gedrängt, meinem hochverehrten Lehrer Herrn Prof. Molisch für das stete Interesse das er meiner Arbeit entgegenbrachte, zu danken; desgleichen den Herren Prof. Richter und Grafe.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Literaturverzeichnis.

1. v. Wisselingh C., Mikroskopische Untersuchungen über die Zellhaut der *Fungi.* Jahrb. für wiss. Bot. (1897), XXXI. Bd., p. 619 bis 685.
2. Hegler R., Untersuchungen über die Organisation der Phycochromaceenzelle. Jahrb. für wiss. Bot. (1901), XXXVI. Bd., p. 229 bis 353.
3. Kohl, Über die Organisation und Physiologie der Phycochromaceenzelle. Jena 1903.
4. Wester D. H., Studien über das Chitin. Archiv der Pharmacie (1909), CCXLVII. Bd., p. 282 u. f.
5. Scholl E., Die Reindarstellung des Chitins aus *Boletus edulis.* Diese Sitzungsberichte, Wien 1908, CXVII. Bd.
6. Viehoever, Über den Nachweis von Chitin bei Bakterien. Ber. d. Deutschen bot. Ges. (1912), XXX. Bd., p. 443 bis 451.
7. Nägeli und Schwendener, Das Mikroskop. 2. Aufl. (1877), p. 505.
8. Correns C., Über Dickenwachstum durch Intussuszeption bei einigen Algenmembranen. Flora 1889, p. 327.
9. v. Wiesner J., Die Rohstoffe des Pflanzenreiches. Leipzig, 2. Bd., 2. Aufl. (1903), p. 247.
10. Mangin, Sur l'emploi du rouge de Ruthénium en anatomie végétale. Compt. rend. (1895).

10*a*. Mangin, Réactifs colorants des substances fondamentales de la membran. Compt. rend., CXI, Bd. (1890).

11. Beijerinck und A. v. Delden, cit. nach Czapek Fr., Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl. (1913), I. Bd.
12. Tschirch, Über Pektin und Protopektin. Ber. der Deutschen pharm. Ges. (1907), XVII. Bd., p. 237.
13. Mirande R., Recherches sur la composition chimique de la membran et le morcellement du thalle chez les siphonales. Annales d. sciences nat., IX[ième] sér., XIII. Bd. (1913), p. 147 bis 264.
14. Abderhalden, Biochemische Arbeitsmethoden, 2. Bd.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Figurenerklärung.

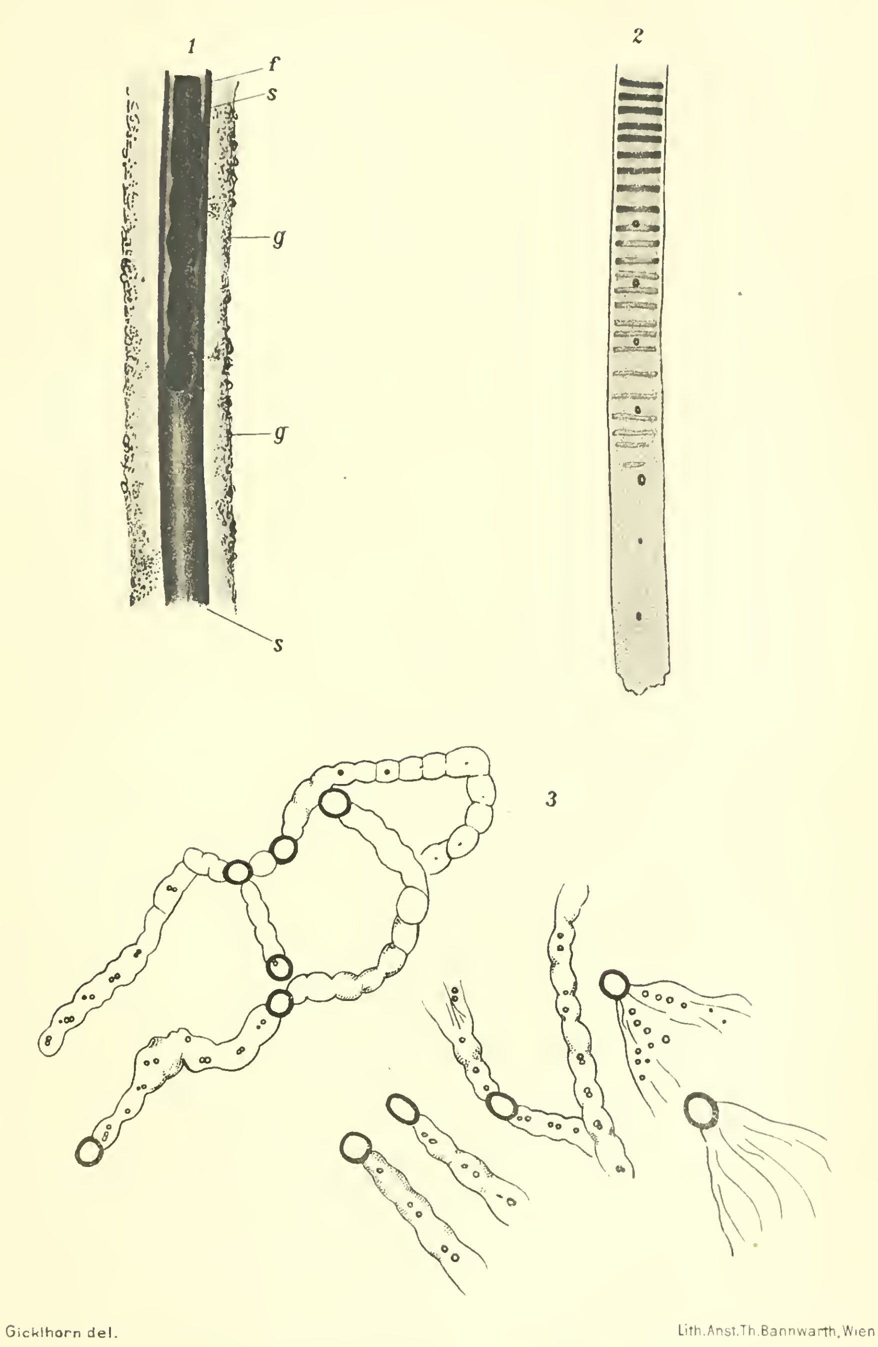
Fig. I. *Rivularia* sp., Zellulosereaktion. Die Fäden wurden mit verdünnter Eau de Javelle entfärbt und dann mit J+H_2SO_4 auf dem Objektträger behandelt. Die Membranen der Fadenzellen *f* wurden braun, die innersten Schichten der Scheide *s* blau, die äußeren, gallertigen Schichten *g* blieben ungefärbt. Vergr. Obj. 8, Ok. 2 (Leitz).

Fig. II. *Scytonema thermale*, Zellulosereaktion. Die Fäden wurden mit Eau de Javelle gereinigt, im zugeschmolzenen Röhrchen in konzentriertem Glyzerin auf 300° erhitzt, hierauf ausgewaschen und mit J+H_2SO_4 auf Zellulose geprüft. Der ganze Faden färbt sich blau, in den äußeren Schichten entstehen ringförmige Gebilde, die stärker blau tingiert sind. Vergr. Obj. 8, Ok. 4 (Leitz).

Fig. III. *Nostoc* sp. wurde eine Stunde in Eau de Javelle eingelegt; darauf zeigten sich die einzelnen Zellfäden freiliegend, da die Gallertmassen gelöst waren. Die Heterocysten waren intakt, in jeder Fadenzelle blieb ein kleines Kügelchen als Rest des Zellinhaltes übrig. Die Querwände verschwanden, der ganze Zellfaden bildete einen Schlauch. Vergr. Obj 8, Ok. 4 (Leitz).

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum



Gicklhorn del.

Lith. Anst. Th. Bannwarth, Wien